云 南 植 物 研 究 2002，24（3）：333～340
Acta Botanica Yunnanica

植物转基因成分 PCR 检测内对照系统的建立*

权洁霞，张艺兵，陈长法，梁成珠，魏晓棠
（青岛出入境检验检疫局，山东 青岛 266002）

摘要：为了建立适用于多种植物的转基因成分 PCR 检测的内对照系统，本文针对植物叶绿体 DNA rbcL 基因的保守区域，设计了一对扩增片段为 433bp 的 PCR 引物，通过对 23 种植物的 PCR 扩增表明，该引物不但在 4 种单子叶植物（大米、玉米、小麦、洋葱）、10 种原始花被亚纲的双子叶植物（甘蓝、白菜、大豆、豇豆、花生、胡萝卜、芹菜、菠菜、大麻、棉花）及 7 种合瓣花亚纲的双子叶植物（圣女果、番茄、辣椒、马铃薯、南瓜、黄瓜、菊苣）中得到了稳定一致的扩增结果，而且在低等的藻类植物（海带、龙须菜）中也得到了特异性的扩增结果。进一步对扩增片段进行的 DNA 序列测定与分析表明，扩增片段的变异水平较低，具有较高的保守性。本系统的建立有助于排除 PCR 检测时的假阴性结果，从而提高检测的准确性，而且能克服现行的“一种植物一种检测内对照”的弊端，有利于提高检测效率、缩短检测周期。

关键词：rbcL 基因；内对照；PCR 检测；转基因成分
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700(2002)03－0333－08

Establishment of A Universal Inner Positive Control for PCR Detection of Genetically Modified Ingredient in Plants

QUAN Jie-Xia[1]，ZHANG Yi-Bing，CHEN Chang-Fa，LIANG Cheng-Zhu，WEI Xiao-Tang
(*Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*，Qingdao 266002，China)

Abstract：In the present study，a primer-pair for the amplification of rbcL 433bp fragment was designed. In order to find out whether this primer-pair can be used as inner positive control for PCR detection of genetically modified ingredient in most plants，it was used to amplify DNA from 23 various plant species including monocotyledon (*Allium cepa*，*Triticum aestivum*，*Zea mays*，*Oryzasativa*)，dicotyledon in Archichlamydeae (*Brassica oleracea*，*Brassica pekinensis*，*Glycine max*，*Vigna unguiculata*，*Arachis hypogaea*，*Daucus carota*，*Apium graveolens*，*Spinacia oleracea*，*Cannabis sativa*，*Gossypium hirsutum*)，dicotyledon in Sympetalae (*Lycopersicon esculentum*，*Lycopersicon esculentum*，*Capsicum frutescens*，*Solanum tuberosum*，*Cucurbita moschate*，*Cucumis sativusl*，*Cichorium intybus*) and algae (*Laminaria angustata*，*Gracilaria lemaneiformis*). The results showed that the primer-pair worked very well over all the samples，and the specific fragment could be amplified via this primer-pair over wide annealing tempera-

---

* 本文所测序列已在 GeneBank 数据库中注册了以下序号：AF479571～AF479576.
通讯作者：To whom all correspondence should be addressed，E-mail：quanjiexia@sina.com Tel：0532－2682240
收稿日期：2001－12－07，2001－02－20 接受发表
作者简介：权洁霞（1972－）女，博士，主要从事分子生物学的研究。

ture. The validity of amplified fragment was further tested via DNA sequencing. These results suggest that amplification of this gene fragment via this primer-pair can be used as inner positive control for PCR detection of genetically modified ingredient in most plants, which will be helpful to the improvement of detection accuracy, as well as the reduction of detection period.

Key words: rbcL gene; Inner positive control; PCR detection; Genetically modified ingredient

转基因产品的安全性问题，即它对人类健康、环境保护、生态平衡等存在的潜在危害受到越来越多的关注。越来越多的国家对转基因产品采取了限制管理措施。随着中国加入 WTO，对进出口的转基因产品进行检测、标注及管理成为我国迫在眉睫的大问题。这对于维护我国贸易利益，保障我国进出口贸易的正常运行有很大的意义。

聚合酶链式反应技术（polymerase chain reaction，简称 PCR 技术）由于具有快速、简便、灵敏等特点，而成为目前对植物进行转基因成分检测最常用的技术之一（Meyer，1995；Wurz and Willmund，1997；Vollenhofer 等，1999；Lipp 等，1999；Hupfer 等，1998；Hassan-Hauser 等，1998）。但是，由于 PCR 技术非常灵敏，很容易出现假阳性、假阴性结果。在检测时，通常设立一系列的对照（内对照、阳性对照、阴性对照、空白对照）以排除假阳性与假阴性。其中，内对照的设立是衡量模板 DNA 质量，从而排除由模板中杂质造成的假阴性结果（即阴性结果并不是因为样品中不含有目的 DNA 片段，而是因为模板 DNA 中的杂质抑制了 PCR 反应）的一个有力措施。据目前的报道来看，转基因大豆的检测一般选 lectin（凝集素）基因为内对照，转基因玉米的检测一般以 invertase（转化酶）基因或 zein（玉米醇溶蛋白）基因为内对照（Vollenhofer 等，1999；Lipp 等，1999）。而有关其他植物转基因成分检测内对照的研究报道尚未见到。另外，面对各种各样植物产品的转基因成分检测，一种植物一种内对照的检测方法很不现实，不但降低了工作效率而且增加了检测周期和检测成本。因此，很有必要建立一个通用的内对照系统，以满足大量的、多种多样的进出口植物产品的转基因成分检测。

一般而言，比较保守的功能基因的保守区域是设立内对照的最佳选择。核酮糖 1，5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基基因（ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit，简称 rbcL）由植物叶绿体 DNA 编码，已报道的 10 余种植物的 rbcL 基因序列表明，其编码区具有高度的保守性（顾红雅等，1997；Ayliffe & Timmis，1992；Kunnimalaiyaan & Nielsen，1997；Lin 等，1986；Mitchelson & Stephen，1991；Morton & Clegg，1993；Nadot 等，1995；Nishizawa & Hirai，1987；Olmstead 等，1993；Savolainen 等，2000；Shimada & Sugiura，1991；Strittnatter & Kossel，1984；Terachi 等，1987）。

因此，本研究以叶绿体 rbcL 基因的保守区域为目标设计引物，以进出口植物产品中比较常见的单子叶植物（大米、玉米、小麦、洋葱）、原始花被亚纲的双子叶植物（甘蓝、白菜、大豆、豇豆、花生、胡萝卜、芹菜、菠菜、大麻、棉花）及合瓣花亚纲的双子叶植物（圣女果、番茄、辣椒、马铃薯、南瓜、黄瓜、菊苣）为实验材料，以 2 种低等藻类（海带和龙须菜）为远缘对照，进行 PCR 扩增，以期优化出对所有样品都有稳定一致的扩增结果的通用引物，从而建立适用于多种植物转基因成分 PCR 检测的内对照系统。本研究将为检验检疫系统植物产品转基因成分检测工作的统一化、标准化提供重要资料。

1　材料与方法

1.1　实验材料

本实验共选用 21 种被子植物和 2 种藻类植物为材料。其中，21 种被子植物分别属于 2 个纲 11 个科，2 种藻类植物主要是作为远缘对照，分别隶属于 2 个门。样品编号、状态、来源及分类地位参见表 1。

表 1　样品简况表

Table 1　Nomenclature，status and collection location of the specimen

分类地位				学名	样品编号	样品状态	样品来源
藻类	褐藻门		海带	*Laminaria angustata*	1	配子体	实验室培养
藻类	红藻门		龙须菜	*Gracilaria lemaneiformis*	2	配子体	实验室培养
双子叶植物纲	原始花被亚纲	十字花科	甘蓝	*Brassica oleracea*	3	种子	日本进口
			白菜	*Brassica pekinensis*	4	叶	青岛市售
		豆科	大豆	*Glycine max*	5	种子	阿根廷进口
			豇豆	*Vigna unguiculata*	6	种子	青岛进口
			花生	*Arachis hypogaea*	7	种子	青岛市售
		伞形科	胡萝卜	*Daucus carota*	8	种子	日本进口
			芹菜	*Apium graveolens*	9	茎	美国进口
		藜科	菠菜	*Spinacia oleracea*	10	种子	荷兰进口
		桑科	大麻	*Cannabis sativa*	11	种子	韩国进口
		锦葵科	棉花	*Gossypium hirsutum*	12	种子	国产（转基因）
	合瓣花亚纲	茄科	圣女果	*Lycopersicon esculentum*	13	果实	青岛市售
			番茄	*Lycopersicon esculentum*	14	种子	青岛市售
			辣椒	*Capsicum frutescens*	15	种子	美国进口
			马铃薯	*Solanum tuberosum*	16	块状茎	青岛市售
		葫芦科	南瓜	*Cucurbita moschate*	17	果实	新西兰进口
			黄瓜	*Cucumis sativusl*	18	种子	荷兰进口
		菊科	菊苣	*Cichorium intybus*	19	种子	荷兰进口
单子叶植物纲		百合科	洋葱	*Allium cepa*	20	种子	美国进口
		禾木科	小麦	*Triticum aestivum*	21	面粉	青岛市售
			玉米	*Zes mays*	22	面粉	青岛市售
			水稻	*Oryza sativa*	23	米粒	青岛市售

1.2　实验方法

1.2.1　**引物设计**　在 genebank 中查找已报道的植物 rbcL 基因的序列，通过番茄、马铃薯、烟草、黄瓜、西葫芦、大豆、小麦、水稻、玉米、矮牵牛、花生、棉花、芦笋等 13 种植物的 rbcL 基因序列（它们在 Genebank 中的序列号依次为：L14403、M76402、M16896、L21937、L21938、Z95552、D00206、D00207、X03034、X04976、U742471、X15886、L05028）的同源性比较，设计了一对引物：rbcL－F：5’－AAT CTT CTA CTG GTA CAT GGA C－3’，rbcL－R：5’－TCA TCA TCT TTG GTA AAA TCA AG－3’，扩增片段为 433bp（包括引物部分）。引物由大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司合成。

1.2.2　**植物总 DNA 的提取与浓度测定**　采用 SDS－蛋白酶 K 法从植物样品中提取总 DNA，具体操作参考王关林等（1998）的植物总 DNA SDS 微量提取及纯化方法。

DNA 浓度通过核酸蛋白分析仪（BECKMAN COULTER DU^{R}640）和电泳－EB 染色的荧光强度双重测定。

1.2.3　**PCR 扩增**　以大豆 DNA 为模板，在 Eppendorf Mastercycler 梯度 PCR 仪上进行退火温度的优化：94℃预变性 3 min，然后进行 35 个热循环，每个循环包括 94℃变性 46s、48～68.5℃退火 1 min、72℃延伸 1 min，之后于 72℃延伸 10 min。每个 PCR 反应体系为 25（L，其中包含 10×Buffer（含 15 mmol/L $MgCl_2$）

2.5（L，dNTPs（Promega 产品）100（mol/L，引物各 0.2（mol/L，Taq DNA 聚合酶（Promega 产品）1.5 U，模板 DNA15～30 ng。

选择合适的退火温度对其余样品进行 PCR 扩增，其它扩增条件同上。

1.2.4　PCR 产物的电泳检测　扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离，EB 染色，ALPHA 数字图象分析系统观察、记录电泳结果，通过与分子量标准（DL－2000）比较确定扩增片段的大小。

1.2.5　PCR 产物的 DNA 序列测定与分析　为了验证扩增片段是不是目的片段，对圣女果、辣椒、白菜、芹菜、洋葱和海带的 PCR 产物进行回收及序列测定，测序用引物为 PCR 引物，具体操作由大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司完成。利用 BLAST 和 MEGA 软件对所测得的序列与 GeneBank 中已报道的序列进行同源性比较。

2　结果

2.1　PCR 退火温度的优化

以大豆 DNA 为模板对退火温度进行了 48～68.5℃的优化，结果见图 1。可以看到，退火温度在 48～61.5℃的范围内均能得到特异性很强的扩增产物，但扩增量上有差异，退火温度为 53.5～56.1℃时扩增量最高（图 1）。

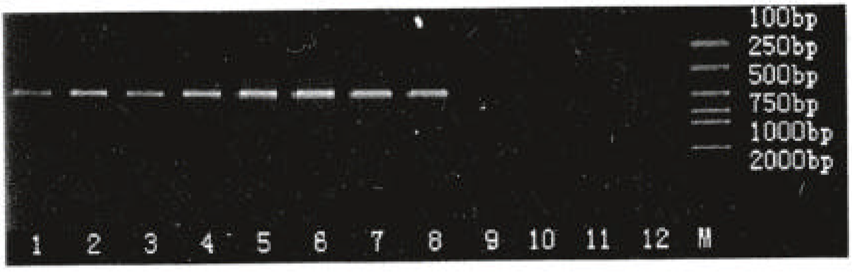

图 1　引物 rbcL-F 和 rbcL-R 在不同退火温度下对大豆的扩增产物电泳图谱（电泳支持物为 2.0% 琼脂糖，1～12 代表退火温度依次为：48℃、48.3℃、49.℃、51.2℃、53.5℃、56.1℃、58.8℃、61.5℃、64℃、66.1℃、67.7℃、68.5℃，M 代表分子量标准 DL－2000）

Fig.1　Electrophoresis of PCR products via primer rbcL-F & rbcL-R at different annealing temperature with soy DNA as the template.（lane 1：48℃；lane 2：48.3℃；lane 3：49.4℃；lane 4：51.2℃；lane 5：53.5℃；lane 6：56.1℃；lane7：58.8℃；lane 8：61.5℃、lane 9：64℃；lane 10：66.1℃；lane 11：67.7℃；lane 12：68.5℃；M：Molecular weight marker DL－2000）

但是，海带和龙须菜在以上退火温度范围内扩增量较低，所以对其退火温度进行了 41.3～56℃的优化，结果见图 2。实验表明，这 7 个温度的特异性都很强，但随着温度升高，扩增量明显降低，其中 41.3～43.1℃时扩增量最高（图 2）。

2.2　目的 DNA 片段的 PCR 扩增

选择 56℃为退火温度对 21 种植物（海带和龙须菜为 43℃）进行了 PCR 扩增（图 3）。从图 3 中可以看到，引物 rbcL-F 和 rbcL-R 不但在 10 种原始花被亚纲的双子叶植物（3～12）甘蓝、白菜、大豆、豇豆、花生、胡萝卜、芹菜、菠菜、大麻、棉花）、7 种合瓣花亚纲的双子叶植物（13～19：圣女果、番茄、辣椒、马铃薯、南瓜、黄瓜、菊苣）及 4 种单子叶植物（20～23：大米、玉米、小麦、洋葱）中得到了稳定一致的扩增结果，而且在非常低等的藻类植物（1～2：海带、龙须菜）中也得到了特异性的扩增结果。扩增片段大小约为 433bp，条带整齐而清晰，没有非特异性杂带。

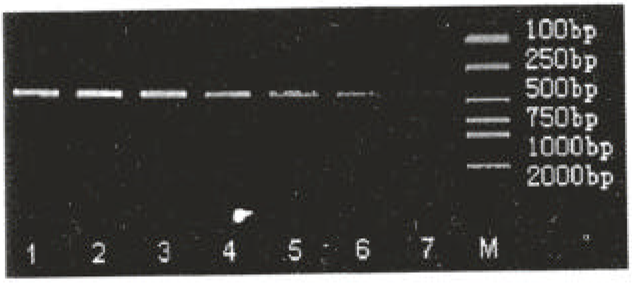

图2　引物 rbcL-F 和 rbcL-R 在不同退火温度下对海带的扩增产物电泳图谱（电泳支持物为2.0%琼脂糖，1～7代表退火温度依次为：41.3℃、43.1℃、45.4℃、48℃、50.7℃、53.5℃、56℃，M 代表分子量标准 DL－2000）

Fig.2　Electrophoresis of PCR products via primer rbcL-F & rbcL-R at different annealing temperature with Laminaria angustata DNA as the template.
（lane 1：41.3℃；lane 2：43.1℃；lane 3：45.4℃；lane 4：48℃；lane 5：50.7℃；lane 6：53.5℃；lane7：56℃；M：Molecular weight marker DL－2000）

2.3　PCR 产物的 DNA 序列分析

为了验证扩增片段是不是目的片段，对圣女果、辣椒、白菜、芹菜、洋葱和海带的 PCR 产物进行了回收及序列测定，在6种植物中均得到了 rbcL 基因 433bp 的序列（图4）。可以看到，圣女果与番茄的 433bp 序列完全相同，A、T、C、G 4种碱基的含量及分布趋势在7种植物之间相差不大。以上分析表明，本实验得到的扩增片段确实是我们的目的片段——植物叶绿体 rbcL 基因部分序列（433bp）。

从图4中还可以看到，圣女果与番茄在 433bp 的序列中未发现任何变异位点，这 433bp 的序列在这7种亲缘关系非常远的植物（分别隶属于2个门、3个纲、5个科）之间未发生任何插入或缺失突变，在海带以外的6种植物之间仅检出74个（占总位点数的17.09%）变异位点，在包括海带在内的7种植物间的变异位点也仅为171个（39.49%）。该序列所编码的氨基酸序列（144个位点）在海带以外的6种植物之间检出59个（40.97%）变异位点，海带与其它6种植物间的变异位点数最高为76个（52.7%），最低为66个（45.83%）。表明此基因片段的变异水平较低，具有较高的保守性。

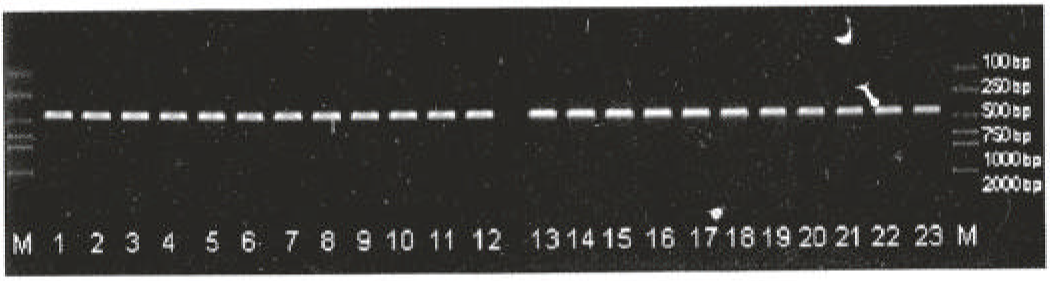

图3　引物 rbcL-F 和 rbcL-R 对23种植物 PCR 扩增产物的电泳图谱（电泳支持物为2.0%琼脂糖，1～23为样品编号详见表1，M 代表分子量标准 DL～2000）

Fig. 3　Electrophoresis of PCR products via primer rbcL-F & rbcL-R over a wide taxonomic range.（lane 1～12 represent the samples under the same order as in Table1. M：Molecular weight marker DL－2000）

3　讨论

3.1　引物的保守性

内对照的设立对于植物转基因成分 PCR 检测结果的准确性来说是非常重要的。如果模板 DNA 中含有能抑制 PCR 反应的杂质，使得本来存在的阳性物质无法得到扩增，从而造成假阴性结果的出现。以植物体中肯定含有的基因成分为内对照对其进行扩增，如果内

```
L14403 AAT CTT CTA CTG GTA CAT GGA CAA CTG TAT GGA CCG ATG GAC TTA CCA GTC TTG ATC GTT ACA AAG GGC GAT GCT ACC GCA TCG AGC GCG TTG [ 93]
L_esc  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... [ 93]
C_fru  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .T. ... [ 93]
B_pek  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ... ... .G. ... ... .C. ... .C. ... ... ... .A. ... ... ... A.. ... ... C.. ..C [ 93]
A_cep  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. ... .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ... ... A.. .T. ..G C.. ... [ 93]
A_gra  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ... ..G .A. ... ... C.. ... [ 93]
L_aug  ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GG TA. .T. ... .A. .CT T.T .A. .TG C.T GC. ..A TC. .T. G.. CAA A.G CA. .TA .AG .A. .T. CA. .AC [ 93]

L14403 TTG GA. .AA AAG ATC AAT ATA TTG CTT ATG TAG CTT ACC CTT TAG ACC TTT TTG AAG AAG GTT CCG TTA CCA ATA TGT TTA CTT CCA TTG TAG [186]
L_esc  ... . ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... [186]
C_fru  ... . ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... [186]
B_pek  CA. . G ..A C.. ... T.. ... .G. ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ... .G. .T. ... .T. .C. ... ... .C. .A. ... .G. [186]
A_cep  ... .. G ..A ... ... ... ... ... ..A ... ... .T. ... ... ... ... ... ... ... ... .T. ... .T. .C. ... ... ... ... ... .G. [186]
A_gra  C.. . G ..A ... ... ... .C. ... ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ... ... .T. ... .T. .C. ... ... ... ... ... ... [186]
L_aug  C. GC. .C. ... .CT ... .A. ..A .T. ... .TG AA. GT. .TT .A. ... ... ... ... .TC ..G .A. .CT .AA CAG ... .T. ..A .T. [186]

L14403 GTA ACA AAT TTG GGT TCA AAG CCC TGC GCG CTC TAC GTC TGG ARG ATC TGC GAA TCC CTC CTG CTT ATG TTA AAA CTT TCC AAG GTC CGC CTC [279]
L_esc  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... [279]
C_fru  ... .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ... ..G ... ..A ... ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... [279]
B_pek  ... ... ... ... ... ... ... ... ..G CT. ... ... ... .A. .G. ... ... ... ... ... ... .G. ... ..A C.. ... ... ... .G. .A. .A. ... [279]
A_cep  ... .T. ... ... .T. ... ... ... ... .A. ... ... ..T .A. .G. ... ... ... .T. .C. ... ... ..T CC. ... ... ... ... .C. ... ... [279]
A_gra  ... .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ... ... ... .CG T.. ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ... [279]
L_aug  ... ... .T. .C. .T. .T. ... .TG .TA AA. ..T ... ... .A. .A. .CA ..A ... .T. ..T T.. ... .CT .A. ... ... ... ... ... .AG ..A [279]

L14403 ATG GGA TCC AAG TTG AAA GAG ATA AAT TGA ACA AGT ATG GTC GTC CCC TGT TGG GAT GTA CTA TTA AAC CTA AAT TGG GGT TAT CTG CAA AAA [372]
L_esc  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... [372]
C_fru  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .T. ... [372]
B_pek  ... .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ... .A. .A. ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ... .C. .G. .G. [372]
A_cep  .C. .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ... .A. ... ... ... ... ... ... .A. ... ... .A. ... .C. ... ... [372]
A_gra  ... .C. ... ... ... .G. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. .T. ... [372]
L_aug  C.. .T. ..G TT. .G. ... ... .A. G.. .AG ... .A. T.. ... ... .TT .C. .A. .TG C.. ..G .A. ... ... ... .A. .TC .T. .A. GT. ... [372]

L14403 ACT ACG GTA GAG CTG TTT ATG AAT GTC TTC GCG GTG GAC TTG ATT TTA CCA AAG ATG ATG A [433]
L_esc  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... . [433]
C_fru  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... . [433]
B_pek  ... .T. ... ... .A. ... ... ... ... .A. .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ... . [433]
A_cep  ... ... ... ... .A. ... .C. ... ... .A. .T. ... .G. ... ... ... ... ... ... ... . [433]
A_gra  ... ... ... ... .G. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... . [433]
L_aug  ... ... .AC .T. TA. ... ... ..G ..T .AA CT. ... .T. ... ... ... ... ... ... ... . [433]
```

图4　7种植物 rbcL 基因 433bp 的 DNA 序列（L14403 为已报道的番茄序列，L-esc、C-fru、B-pek、A-cep、A-gra、L-agu 依次代表圣女果、辣椒、白菜、洋葱、芹菜和海带）

Fig.4　Nucleotide sequences of the 433bp fragment of rbcL gene for 7 different plants（L14403：sequcence of Lycopersicon dsculentum published in GeneBank；L-esc：*Lycopersicon dsculentum*；C-fru：*Capsicum frutescens*；B-pek：*Brassica pekinensis*；A-cep：*Allium cepa*；A-gra：*Apium graveclens*；L-agu：*Laminaria angustata*）

对照基因扩增成功，则表明模板 DNA 质量、数量及 PCR 体系工作正常。如果内对照基因扩增失败，则表明扩增体系中含有抑制成分，需对模板质量、数量进行优化以消除抑制因子。显然，内对照的设立是衡量模板 DNA 质量，从而排除由模板中杂质造成的假阴性结果的一个有力措施。

通过设立内对照的作用不难看出，作为通用内对照的基因片段必须具有高度的保守性，即在任何植物体中都必须存在。本文所设计引物的保守性主要由以下 4 方面得到保证：1）叶绿体是植物中普遍存在的器官。2）已报道的资料表明，由植物叶绿体 DNA 编码的 rbcL 基因的编码区具有高度的保守性。3）在设计引物时使用了 13 种植物的序列，这 13 种植物既有 4 种单子叶植物（禾本科的小麦、水稻、玉米，百合科的芦笋），又有 9 种双子叶植物，这 9 种双子叶植物既包括合瓣花亚纲植物（茄科的番茄、马铃薯、烟草、矮牵牛，葫芦科的黄瓜、西葫芦），又包括原始花被亚纲植物（豆科的大豆、花生，和锦葵科的棉花），而且引物所在区域的序列在这 13 种植物（隶属于 2 个纲、6 个科）中完全相同。4）对扩增产物的 DNA 序列的测定与分析表明，圣女果与番茄在 433bp 的序列中未发现任何变异位点，而且这 433bp 的序列在分别隶属于 2 个纲、3 个亚纲、4 个科的 5 种植物之间检出比较低的变异水平，显示出较高的保守性。

3.2　引物的通用性

本文对进出口植物产品中常见的 4 种单子叶植物、10 种原始花被亚纲的双子叶植物及 7 种合瓣花亚纲的双子叶植物进行了 rbcL 基因片段的扩增，均得到了稳定一致的扩增结果，同时在亲缘关系非常远、非常低等的 2 种藻类植物（属于 2 个不同的门）中也得到了特异性的扩增结果。这表明本实验设计的引物具有很广泛的物种适用范围。

本实验室对出入境植物产品进行的大量的转基因成分检测业务表明，本文设计的引物及优化的扩增条件不但成功地用于多种植物原料的扩增，而且在豆腐、豆腐皮、大豆分离蛋白、面粉、淀粉、结晶淀粉等植物加工产品中都有特异性很强的扩增条带。

本文设计的引物适用的退火温度范围很广，在 41.3～61.5℃的范围内均能得到特异性很强的扩增产物，无非特异性扩增，这一特点非常有利于跟其它检测项目（如 35S 启动子、NOS 终止子、标记基因或目的基因）的引物随意搭配进行多重 PCR，从而提高检测效率、缩短检测周期。

3.3　所建系统的优越性在检验检疫业务中的应用

如上所述，本文建立的内对照系统不但可有效地防止假阴性结果的出现，而且具有很广泛的适用范围，这些优越性对于出入境植物产品中转基因成分的检测业务有非常重要的意义。首先，保证检验结果的准确性和可重复性是检验检疫业务的关键和基础，本研究结果及其在本实验室检验业务中的应用均表明，本内对照系统扩增特异性强，能有效避免假阴性结果的出现。其次，在保证结果准确、可靠的基础上，尽可能提高检测效率、缩短检测周期是出入境检验检疫业务的一个重要要求，而我们的检验对象又可能同时涉及到多个物种、多个产品类型，这就对检测技术的通用性和高通量性要求较高。本研究建立的内对照系统具有广泛的通用性，既能满足多物种、多产品类型同时检测的要求，又可能通过与其它检测项目的多重 PCR 进行高通量检测，这些特点对于提高检测效率、缩短检测周期都很有意义。

致谢 在样品收集、实验工作、论文制作等过程中得到岳志芹博士、李雅红、刘香梅、梁伟及青岛检验检疫局动植物疫病鉴定科全体同志的热情帮助和支持。

〔参 考 文 献〕

王关林，方宏筠. 1998. 植物基因工程原理与技术［M］. 北京：科学出版社，598—599

顾红雅，瞿礼嘉，明小天等. 1997. 植物基因与分子操作［M］. 北京：北京大学出版社

Ayliffe MA，Timmis JN，1992. Plastid DNA sequence homologies in the tobacco nclear genome［J］. *Mol Gen Genet*，**236**（1）：105—112

Hassan-Hauser C，Mayer W，Hörtner H，1998. Detection of the starch modifying *gbss*-antisense construct in transgenic potatoes［J］. *Z Lebensm Unters Forsch*，**206**：83—87

Hupfer C，Hotzel H，Sachse K，*et al*. 1998. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction［J］. *Z Lebensm Unters Forsch*，**206**：203—207

Kunnimalaiyaan M，Nielsen BL，1997. Fine mapping of replication origins（ori A and ori B）in Nicotiana tabacum chloroplast DNA［J］. *Nucleic Acids Res* . **25**（18）：3681—3686

Lin CM，Liu ZQ，Kung SD，1986. Nicotiana chloroplast genome：X. Correlation between the DNA sequences and the isoelectric focusing patterns of the LS of Rubisco［J］. *Plant Mol Biol*. **6**：81—87

Lipp M，Brodmann P，Pietsch K，*et al*. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder［J］. *Journal of AOAC International*，**82**（4）：923—928

Meyer R，1995. Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction（PCR）using the FLACR SAVR tomato as an example［J］. *Z Lebensm Unters Forsch*，**201**：583—586（German）

Mitchelson K and Stephen J，1991. Processing of histidine transfer RNA precursors in tobacco chloroplasts［J］. *Nucleic Acids Res*，**19**（11）：3150

Morton BR，Clegg MT，1993. A chloroplast DNA mutational hotspot and gene conversion in a noncoding region near rbcL in the grass family（Poaceae）［J］. *Curr Genet*，**24**（4）：357—365

Nadot S，Bittar G，Carter L，*et al*，1995. A phylogenetic analysis of monocotyledons based on the chloroplast gene rps4，using parsimony and a new numerical phenetics method［J］. *Mol Phylogenet Evol*. **4**（3）：257—282

Nishizawa Y，Hirai A. 1987. Nucleotide sequence and expression of the gene for the large subunit of rice ribulose 1，5 – bisphosphate carboxylase［J］. *Jpn J Genet*，**62**：389—395

Olmstead RG，Bremer B，Scott KM，*et al*，1993. A parsimony analysis of the Asteridae sensu lato based on rbcL sequences［J］. *Ann Missouri Bot Garden*，**80**：700—722

Savolainen V，Mark WC，Aara BH，*et al*. 2000. Phylogenetics of flowering plants based on plastid atpB and rbcL gene sequences［J］. *Syst Biol*，**49**（2）：306—362

Shimada H，Sugiura M，1991. Fine structural features of the chloroplast genome：comparison of the sequenced chloroplast genomes［J］. *Nucleic Acids Res*，**19**（5）：983—995

Strittmatter G，Kossel H，1984. Cotranscription and processing of 23S，4.5S and 5S rRNA in chloroplasts from Zea mays［J］. *Nucleic Acids Res*，**12**（20）：7633—7647

Terachi T，Ogihara Y，Tsunewaki K，1987. The molecular basis of genetic diversity among cytoplasms of Triticum and Aegilops. VI. Complete nucleotide sequences of the rbcL genes encoding H – and L – type Rubisco large subunits in common Wheat and *Ae. crassa* 4x［J］. *Jpn J Genet*，**62**：375—387

Vollenhofer S，Burg K，Schmidt J，*et al*，1999. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction［J］. *J Agric Food Chem*，**47**：5038—5043

Wurz A，Willmund R，1997. Identification of transgenic glyphosate-resistant soybeans. In：Schreiber GA，Bögl KW，Eds. Foods Produced by Means of Genetic Engineering，2nd Status Report［C］. Berlin：Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine，BgVV Hdfte **1**，115—117